

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Metabolomikai vizsgálatok egészséges és patológiás  
állapotokban**

Guba Andrea

Témavezető: Dr. Kalló Gergő



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2025

# METABOLOMIKAI VIZSGÁLATOK EGÉSZSÉGES ÉS PATOLÓGIÁS ÁLLAPOTOKBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Guba Andrea okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és Immunbiológia doktori iskolája  
keretében

Témavezető: Dr. Kalló Gergő.

Az értekezés bírálói:

Dr. Drahos László, PhD  
Dr. Bak István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora  
tagok: Dr. Drahos László, PhD  
Dr. Bak István, PhD  
Dr. Kiss Attila, PhD  
Dr. Szabó Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja:  
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2025. október 30. 13 óra

# 1. Bevezetés

## 1.1. Metabolomikai analízisek endogén molekulák vizsgálatára

A metabolomikai analízis a biológiai rendszerekben zajló metabolikus folyamatok átfogó vizsgálatát jelenti, amely során az endogén molekulák, például lipidek, aminosavak és szénhidrátok koncentrációját és dinamikáját vizsgálják. Az endogén molekulák olyan anyagok, amelyek a szervezetben természetes úton keletkeznek, és fontos szerepet játszanak az élő rendszerek biokémiai folyamataiban. A metabolomikai kutatások során ezeknek a molekuláknak az azonosítása és mennyiségi meghatározása történik, valamint ezen adatokból a molekuláris interakciókra és az adott metabolitokra adott biológiai válaszokra következtethetünk. Emiatt a szervezet endogén molekuláinak, mint például a nitrogéntartalmú szerves molekulák vizsgálata kiemelten fontos az élő szervezetek működésének megértése szempontjából.

### 1.1.1. Aminosavak szerkezete és élettani funkciói

Az aminosavak a fehérjék elemi építőkövei, melyekből az emberi szervezetben 20  $\alpha$ -aminosav és az iminosav prolin használódik fel a fehérjék szintézisére. Mint a nevéből is kiderül ezek a vegyületek olyan karbonsavak melyekben az  $\alpha$ -helyzetű szénatomhoz egy aminocsoport kapcsolódik. Az egyes aminosavak az  $\alpha$ -szénatomhoz kapcsolódó oldallácaikban különböznek egymástól és a glicin kivételével legalább egy kiralitáscentrumot tartalmaznak. A proteinogén aminosavak L-aminosavak, az emberi szervezetben jellemzően csak kis mennyiségű D-aminosav található. Az aminosavak csoportosítása több féle képen történhet, az egyik gyakori csoportosítás az oldallánc kémiai karakterisztikája alapján történik.

Az oldallánc, amely egyetlen hidrogén atomtól - mint a glicin esetében - egészen az összetett aromás gyűrűkig terjedhet - mint a triptofán esetében - egyedi kémiai és fizikai tulajdonságokkal ruhazza fel az egyes aminosavakat. Ezen oldalláncok változatossága okozza az egyes aminosavak sajátos kémiai viselkedését és funkcióit.

Egy másik csoportosítási lehetőség az aminosavak esszencialitása alapján történik. Definíció szerint azokat az aminosavakat, amelyeket a szervezet nem tud saját maga szintetizálni, és a táplálékkal kell felvenni, esszenciális aminosavaknak nevezzük. Ide tartozik többek között a fenilalanin, a valin, a triptofán, a treonin, az izoleucin, a metionin, a hisztidin, a leucin és a lizin. Ezzel szemben a nem esszenciális aminosavak a szervezetben más molekulákból szintetizálhatók, és nem szükséges a táplálékkal történő bevitelük.

Továbbá, léteznek olyan aminosavak is, amelyek normál körülmények között nem esszenciálisak, de bizonyos helyzetekben esszenciálissá válhatnak, ezek a feltételesen esszenciális aminosavak.

A fehérjeszintézisben betöltött szerepük mellett az aminosavak képesek az anyagcsere útvonalak szabályzására is. Bizonyos aminosavakat különféle patológiai állapotokban potenciális biomarkerként azonosítottak. Depressziós és egyéb mentális zavarokban szenvedő egyéneknél csökkent szérum triptofán szintet figyeltek meg, míg tüdő-, gyomor-, vastagbél-, emlő- és prosztatadaganatos betegek esetében több aminosav szintjének változását is kimutatták. Bár a különféle tumorok esetében más-más aminosav szintje bizonyult indikatívnak, a glutamin minden daganatos elváltozás esetében esszenciális a tumorsejtek osztódása szempontjából. A mentális zavarok és daganatos elváltozások mellett az aminosavak a cukorbetegség patomechanizmusában is szerepet játszanak. Az inzulin gátolja a fehérjék lebontását, miközben fokozza az aminosavak felvételét a sejtekbe. Ezenkívül a lizin, aszpartát, treonin, metionin és alanin a 2-es típusú cukorbetegség potenciális biomarkereinek bizonyultak.

### **1.1.2. Biogén aminok szerkezete és élettani funkciója**

A biogén aminok a nitrogéntartalmú szerves vegyületek csoportjába tartoznak. A legtöbb biogén amin előállítására több különböző sejtípus is képes, míg bizonyos biogén aminok, például a szerotonin előállítására csak bizonyos dedikált sejtípusok, például a neuronok képesek.

A biogén aminok változatos élettani funkciókkal rendelkeznek. A hisztamin fontos szerepet tölt be a sejtproliferációban, és differenciációban, a regenerációban és a sebgyógyulásban, az érrendszer permeabilizációjában, neurotranszmissziós folyamatokban; valamint a gyulladásos reakciókban is. A triptamin, a tiramin és a 2-fenetil-amin neuromodulátorként és vaszkuláris regulátorokként szerepet játszanak az idegrendszeri és érrendszeri funkciókban, míg a kadaverin és a putreszcin a sejtosztódás fontos molekulái. Élettani szerepük mellett a biogén aminok számos betegség patomechanizmusában, mint például a magas vérnyomás, a skizofrénia és a rák kialakulásában is szerepet játszanak. Egy japán populáción végzett vizsgálat során negatív korrelációt mutattak ki az etilamin mennyisége és a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának kockázata között. A metil-amin az egyik legegyszerűbb alifás amin az emberi szervezetben, melyet számos szövetben és testfolyadékban azonosítottak. A metil-amin szerepét megfigyelték központi idegrendszeri

zavarok esetén, valamint igazolták, hogy terhességi toxémia esetén a metil-amin koncentrációja szülés után hosszabb ideig magasabb marad, mint normál terhesség esetén. Az etanolamin az emberi test minden sejtjében jelen van a foszfolipidek alkotórészeként, valamint szabad formában a testfolyadékokban is megtalálható. A foszfatidil-etanolamin fő alkotórészeként az etanolamin szerepet játszik a neurodegeneratív rendellenességek, mint például a Parkinson-kór progressziójában, a tumorfejlődésben és a ferroptózis folyamataiban. A szerotonin, mint a központi idegrendszer fontos neurotranszmittere kulcsszerepet játszik a depresszió kialakulásában, valamint összefüggésbe hozható az elhízással és a cukorbetegséggel is.

### **1.1.3. Aminosavak és biogén aminok vizsgálati lehetőségei**

Az aminosavak és biogén aminok vizsgálata számos biokémiai és analitikai módszerrel lehetséges, mint például a gázkromatográfia (GC), folyadékkromatográfia (LC), mágneses magrezonancia (NMR) és tömegspektrometria (MS). A nagy érzékenységgű LC-MS rendszerek segítségével az alacsony koncentrációban jelen levő molekulák is vizsgálhatók komplex biológiai mintákban. LC és LC-MS analízisek esetében mégis gyakran szükség van a célvegyületek módosítására a detektálási és kvantitálási határ javítása érdekében. A származékképzés a vizsgálandó molekula és egy reagens közötti kémiai reakciót jelent, amely megváltoztatja a molekula kémiai és fizikai tulajdonságait. A molekulák ilyen jellegű módosításával a derivatizálás javítja a detektálást, az elválasztási hatékonyságot és az illékonyt, valamint stabilizálja a molekulákat, ami jobb kromatográfiás analízist tesz lehetővé. Az aminosavak és biogén aminok származékképzésére számos reagens használható, mint például dansil-klorid (DnsCl), ftáldehid (OPA), 9-fluorenil-metil-klórformiát-klorid (FMOC-Cl) vagy az AccQ-Tag. A tömegspektrometria sok esetben a kromatográfiás analízisek kiegészítőjeként használható az elemzések szelektivitásának és érzékenységének növelése érdekében, valamint az ultraibolya (UV) vagy fluoreszcens detektálással azonosított komponensek megerősítésére.

#### **1.1.3.1. Az AccQ-Tag derivatizációs technika**

Az AccQ-Tag derivatizációs technika (Waters), egyfajta származékképzés, ami a 6-aminokinolil-N-hidroxisukcinimidil-karbamátot (ACQ) használja a primer és szekunder aminok rendkívül stabil fluoreszcens származékokká történő átalakítására. A reakció első lépésében a primer és szekunder aminok reakcióba lépnek az ACQ reagenssel. A második lépés egy lassabb reakció, ahol a fennmaradt reagens vízzel reagál, és 6-aminokinolin

(AMQ), N-hidroxszukcinimid és CO<sub>2</sub> melléktermékek képződnek. A derivatizálás utolsó lépése során a fő melléktermék, az AMQ és a fennmaradt reagens egymással egy rendkívül stabil bisz-aminokinolin-karbamidot képez. Ezek a melléktermékek nem befolyásolják az aminosavak azonosítását vagy mennyiségi meghatározását, viszont a kromatográfias analízis során minőségi kontrollként szolgálhatnak a derivatizálási reakció sikerességének és hatékonyságának bizonyítására. A derivatizált aminosavak folyadékkromatográfiával elválaszthatók, a fluoreszcens származékok pedig 260 nm hullámhosszon detektálhatók.

## **1.2. Metabolomikai analízisek xenobiotikumok vizsgálatára**

A xenobiotikumok olyan anyagok, melyek nem természetes részei az élő szervezetek anyagcseréjének, azonban bejuthatnak a szervezetbe. Xenobiotikumok lehetnek például a gyógyszerek, vegyi anyagok, ipari szennyezők, peszticidek vagy egyéb környezeti toxikus anyagok. A metabolomikai elemzések lehetőséget biztosítanak ezen anyagok biológiai rendszerekre gyakorolt hatásának vizsgálatára, ezáltal információt nyerhetünk arról, hogy ezek a xenobiotikumok hogyan változtatják meg az élő szervezetek anyagcserefolyamatait. A xenobiotikumok a szervezetben komplex és dinamikus folyamatokat, például biotranszformációs reakciókat indítanak el, melyek során a szervezet megpróbálja a vegyületeket inaktíválni és/vagy eltávolítani. E folyamatok során az anyagok új metabolitok formájában jelennek meg, melyek változatos módon hatnak a biológiai rendszerekre.

A xenobiotikumokkal kapcsolatos metabolomikai analízisek rendkívül fontosak a toxikológiai kutatásokban, mivel segítenek az ipari és gyógyszeripari termékek biztonságának és hatékonyságának felmérésében. Továbbá, az egyes vegyületek biotranszformációs profiljának elemzése segíthet a személyre szabott orvoslásban is, mivel az emberek között előforduló genetikai különbségek befolyásolhatják a xenobiotikumok metabolizmusát, így a kezelés optimalizálható.

A metabolomikának kulcsfontosságú szerepe van a terápiás gyógyszer-szint-monitorozásban (therapeutic drug monitoring, TDM) is, mivel lehetővé teszi a gyógyszerek hatásainak, metabolizmusának és kiválasztódásának részletes és átfogó vizsgálatát a szervezetben. A TDM célja, hogy biztosítsa a gyógyszer hatékony, ugyanakkor biztonságos alkalmazását, azáltal, hogy figyelemmel kíséri a gyógyszerek és azok metabolitjainak koncentrációját a vérplazmában vagy egyéb biológiai mintákban, és ez alapján meghatározza az optimális dózist. Ez legfőképpen a szűk terápiás tartománnyal és toxikus

mellékhatásokkal rendelkező gyógyszereket érinti, valamint azon terápiás készítményeket, melyek biotranszformációja során inaktív vagy toxikus metabolitok képződhetnek.

### **1.2.1. Az autoimmun hepatitisz és kezelése**

Az autoimmun hepatitisz (AIH) egy ritka krónikus gyulladással járó májbetegség, amely elsősorban nőket érint, de minden nemnél bármely életkorban előfordulhat. Az AIH-t a szérumban emelkedett immunglobulin G és a keringő autoantitestek emelkedett szintje, a transzaminázok fokozott aktivitása és májgyulladás jellemzi. A visszatérő májbetegségek, mint a cirrózis, akut hepatitis és végstádiumú májbetegség kialakulásának megelőzése érdekében az AIH kezelése a legtöbb esetben élethosszig tartó terápiát igényel. Kezelése az esetek többségében szteroid-monoterápiával kezdődik, amelyet az azatioprinnal (AZA) végzett fenntartó kezelés követ. Bár a hosszú távú szteroidterápia számos mellékhatást, például cukorbetegséget, hipertóniát és súlygyarapodást okozhat, ezek előfordulása csökkenthető az AZA és szteroidok kombinált alkalmazásával.

### **1.2.2. Az azatioprin metabolizmusa**

Az AZA metabolizmusa összetett, és több enzimátikus útvonalat foglal magában, amelyek aktív, inaktív és potenciálisan toxikus metabolitokat eredményeznek.

Az AZA körülbelül 88%-a a gyomor-bél traktusból történő felszívódást követően a vörösvértestekben (VVT) a glutatione-S-transzferáz (GST) segítségével 6-merkaptopurinná (6-MP) és metilnitro-tioimidazollá alakul át. A 6-MP a továbbiakban több útvonalon keresztül metabolizálódhat. A tiopurin-metiltranszferáz (TPMT) enzim katalizálta reakcióban metilálódhat 6-metil-merkaptopurin riboziddá (6MMP<sub>r</sub>), ami potenciális hepatotoxikus vegyület. A xantin-oxidáz (XO) által inaktív 6-tiuronsavvá (6-TA) alakulhat; illetve a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) révén 6-tiozin-monofoszfáttá (6-TIMP) konvertálódhat. A TPMT képes a 6-TIMP S-metilációját is katalizálni, így 6-metiltioinozin-monofoszfát (6-MeTIMP) keletkezik. Mind a 6-TIMP, mind a 6-MeTIMP gátolja a foszforibozil-pirofoszfát-amidotranszferáz enzimet, ezáltal csökkentve a *de novo* purin bioszintézis mértékét. Ezt követően a 6-TIMP egy kétlépcsős reakcióban 6-tioguanin-nukleotidokká (6-TGN) alakul át. Első lépésként az inozin-5-monofoszfát-dehidrogenáz (IMPDH) által katalizált reakcióban 6-tioxantozin-monofoszfáttá (6-TXMP) alakul, amelyet a guanidin-5-monofoszfát-szintetáz (GMPS) alakít át 6-TGN-é. A 6-TGN-ek tekinthetők az AZA fő terápiás metabolitjainak. A 6-TGN-

ek sorozatos foszforilációs lépésekben átalakulnak 6-tioguanin-monofoszfáttá (6-TGMP) majd 6-tioguanin-difoszfáttá (6-TGDP) és végül 6-tioguanin-trifoszfáttá (6-TGTP). Bár a 6-TGN-eket tekintik a fő terápiás metabolitoknak, magas szintjük azonban életveszélyes mieloszupressziót okozhat.

### **1.2.3. Az azatioprin terápiás felhasználása**

Az AIH kezelésén kívül az AZA és metabolitjainak alkalmazása kiterjed a krónikus gyulladással járó betegségekre, gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) és gyulladással járó bélbetegségekre (IBD) kezelésére is. Az AZA-t eredetileg a gyermekkori leukémia kezelésére fejlesztették ki, azonban a T-sejtekre gyakorolt antiproliferatív hatásának felismerése következtében sikeresen alkalmazzák autoimmun betegségek kezelésében és a szervátültetést követő kilökődés megelőzésére. A tiopurinok immunszuppresszív hatásának pontos molekuláris mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, ám ismeretes, hogy az endogén purinokkal szembeni antagonistikus hatásuk révén beavatkozhatnak a DNS-replikációba. A tiopurin gyógyszerek hatékonyak a betegség kiújulásának megelőzésében, de nem alkalmasak a remisszió indukálására. Biológiai gyógyszerekkel, például tumor nekrozis faktor (TNF) elleni szerekkel kombinálva kedvező hatás érhető el, mivel javítják a klinikai remissziót és a nyálkahártya gyógyulását. Azonban azon betegek körében, akiknél antitestek képződnek egy anti-TNF készítménnyel szemben, jelentősen nagyobb a valószínűsége annak, hogy egy következő anti-TNF terápia során is antitestek keletkeznek. Ilyen esetekben a kombinált anti-TNF és tiopurin terápia során a TDM alkalmazása elősegítheti az immunogenitás megelőzését a második anti-TNF kezelés esetén. A TDM alkalmazása az anti-TNF és tiopurin kombinációs terápiában nemcsak a biológiai hatóanyag szintjének monitorozását, hanem a 6-TG szintjének ellenőrzését és a tiopurin koncentrációjának optimalizálását is magában kell foglalnia a biológiai hatások maximalizálása érdekében. A tiopurin szintjének dózismódosítással vagy farmakológiai manipulációval történő optimalizálása költséghatékonyabb lehet, mint a biológiai hatóanyag dózisének növelése.

Az AZA szint stabilizálódásához 2-4 hetes kezelésre van szükség, ami más immunszuppresszáns kezeléshez képest hosszabb idő. Az AZA kezelés laboratóriumi monitorozása magában foglalja a teljes vérkép elemzést és a májfunkciós tesztek elvégzését, különös figyelmet fordítva a hepatitis és a leukopénia előjeleinek megjelenésére. A kezelés során az első két hónapban kéthetente, ezt követően pedig háromhavonta javasolt a

laboratóriumi ellenőrzés. A Brit Gasztroenterológiai Társaság nemrégiben egy olyan ajánlást fogalmazott meg, hogy az IBD AZA kezelése során a tiopurin metabolitokat is ellenőrizni kell a toxicitás és a dozírozási hibák megelőzése érdekében. A rendelkezésre álló adatok többsége IBD-betegekre vonatkozó vizsgálatokból származik, és az autoimmun AIH kezelésében alkalmazott AZA-ra vonatkozó specifikus ajánlások még nem kerültek kidolgozásra. A tiopurin-metabolitok nyomon követése a 6-TGN és 6-MMP koncentrációjának mérésével történhet az eritrocitákban, ezt követően pedig az AZA dózisa úgy módosítható, hogy a 6-TGN és 6-MMP koncentrációk a normális terápiás tartományban maradjanak. Ez különösen fontos azoknál a betegeknél, akik nem mutatnak megfelelő választ a kezelésre, vagy akiknél toxikus metabolitok halmozódnak fel. A tiopurin-metabolitok monitorozása azonban csupán a standard laboratóriumi mérések kiegészítő elemzését jelenti.

### **1.3. Folyadékkromatográfia-tömegspektrometria**

Biológiai minták, mint például a vér vagy más testfolyadékok analitikai vizsgálata során nagyon fontos a minták komplexitásának csökkentése annak érdekében, hogy minél több információ legyen kinyerhető egy mintából. A különféle elválasztástechnikai eljárások egyik legszélesebb körben használt formája a folyadékkromatográfia, azon belül is a nagyhatékonyságú- vagy ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC és UHPLC). A nagy felbontóképesség, jó reprodukálhatóság, az elválasztást biztosító kölcsönhatási típusok széles választéka és a tömegspektrometriás analízissel való kompatibilitás miatt a folyadékkromatográfia széles körben alkalmazott a különféle omikai, például proteomikai és metabolomikai kutatások során. A kromatográfban a vizsgálandó vegyületek elválasztása a fizikai kémia tulajdonságokon alapul, míg a tömegspektrométerben a kromatográfiás oszlopról eluálódó komponensek, az ionizációt követő tömeg/töltés ( $m/z$ ) viszony alapján kerülnek elválasztásra. Komplex biológiai minták esetében mindkét elválasztási mód előnyei kihasználhatók. Megfelelő kromatográfiás elválasztás segítségével csökkenthető a mátrix hatás, az ionszupresszió, valamint lehetőséget biztosít izobár vegyületek elválasztására és vizsgálatára is.

A tömegspektrométer működése során semleges részecskékből gáz fázisú ionokat állít elő, majd az ionok elválasztását végzi tömeg/töltés ( $m/z$ ) arányuk alapján. Az egyes tömegspektrométerek különféle ionforrásokat és tömeganalizátorokat tartalmaznak, melyek

eltérő fizikai/kémiai tulajdonságokat használnak ki az ionizációhoz és az ionok elválasztásához.

### **1.3.1. Ionizációs technikák**

Különböző ionizációs technikák ismertek, melyek feladata a vizsgálandó minták ionizációja és gázhalmazállapotba alakítása. Kromatográfias elválasztással kapcsolt analízis során a leggyakrabban három ionizációs technikát alkalmaznak, az elektroperlasztásos ionizációt (Electrospray Ionization, ESI), atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) és az atmoszférikus nyomású fotoionizáció (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Az alkalmazott ionizációs technika kiválasztása nagymértékben függ a komponensek méretétől és polaritásától. Ezen ionizációs technikák az úgynevezett lágy ionizációs technikák csoportjába tartoznak, amely azt jelenti, hogy az ionizáció során a molekulák nem fragmentálódnak. Az ESI során a kromatográfias oszlopról eluálódó mintát egy nagyfeszültségre kapcsolt kapillárison keresztül áramoltatják át, majd egy hőmérséklet gradiens és szárítógáz alkalmazásával az oldószer elpárolgása után az ionizált célmolekulák bejutnak a tömegspektrométerbe, ahol megtörténik az ionok  $m/z$  alapú elválasztása.

### **1.3.2. Tömeganalizátorok**

Az analizátorok feladata az ionforrásból érkező ionok tömeg/töltés ( $m/z$ ) arányuk szerinti elválasztása. Az elválasztás történhet elektromos áram vagy mágneses mező segítségével. Az analizátorok csoportosítása működési elvük és felbontásuk alapján történhet így megkülönböztethetünk kis, közepes és nagyfelbontású tömeganalizátorokat. A leggyakoribb analizátorok a kvadrupol analizátor (Q), repülési idő analizátor (TOF), ioncsapda (IT), ion ciklotron rezonancia analizátor (ICR), Orbitrap (OT) és ion mobilitási cella (IM).

### **1.3.3. Tandem tömegspektrometria**

Az egyszerű tömegspektrométerek használata mellett igen elterjedt az úgynevezett tandem tömegspektrométerek használata. A tandem tömegspektrométerek több analizátort is tartalmaznak és használatukkal lehetőség van a célmolekulák fragmentálására, ezáltal fontos szerkezeti információk nyerhetők a tandem tömegspektrométerekből (MS/MS). A tandem tömegspektrométerek tartalmazhatnak több ugyanazon az elven működő analizátort,

például a három kvadrupollal felszerelt készülékeket, de lehetnek úgynevezett hibrid készülékek, amelyek több különböző elven működő analizátort tartalmaznak, ilyen készülék a QTRAP hibrid tandem tömegspektrométer (Sciex), amely kvadrupol és ioncsapda analizátorokat tartalmaz. A QTRAP rendszer különlegessége, hogy beállítástól függően a harmadik kvadrupol képes lineáris ioncsapda üzemmódban is működni. A hibrid felépítésnek köszönhetően a készülékkel különféle analízisformák érhetőek el, mint például a fragmens ion analízis, prekursor ion analízis, semleges vesztes vizsgálat vagy az úgynevezett Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM, MRM).

SRM módban működve a készülék csak egy előre meghatározott prekursor ion enged bejutni az ütközési cellába, majd a képződött fragmens ionok közül a harmadik kvadrupol csak egy előre meghatározott fragmenst enged tovább a detektorba. Így a tömegspektrométer csak a kiválasztott prekursor ion és a hozzá tartozó kiválasztott fragmens ion együttes jelenléte esetén regisztrál jelet. A prekursor ion-fragmens ion párhoz tartozó  $m/z$  értékek, úgynevezett SRM átmenetek, beállítása biztosítja a módszer szelektivitását és specifikusságát. A görbe alatti terület (AUC) arányos a tömegspektrométerbe bejutott anyag mennyiségével, így a módszer kvantitatív vizsgálatokra is kiválóan alkalmazható. Szemi-kvantitatív módban az SRM módszer jól alkalmazható relatív kvantitálásra, azonban megfelelő beállításokkal abszolút kvantitálás is lehetséges. Mind relatív, mind abszolút kvantitálásnál szükség van stabil izotóppal jelzett (SIL) referencia molekulák használatára, melyek belső standardként funkcionálnak az analízisek során. SRM analízis során a tömegspektrométer több száz átmenet egyidejű vizsgálatára képes, ezáltal több célmolekula vizsgálatára is alkalmas ugyanazon mintából. Az SRM módszerek érzékenysége tovább javítható, ha a célmolekulákat egy megadott retenciós idő ablakban monitorozzuk, ez az úgynevezett „scheduled” SRM módszer, melynek segítségével több száz komponens megfelelő érzékenységű vizsgálata is lehetséges relatíve rövid kromatográfiai elválasztás mellett is.

## **2. Célkitűzések**

Munkám során célzott tömegspektrometriás módszerek fejlesztését és alkalmazását tűztem ki célul metabolomikai kérdések megválaszolásához. A kutatás során az alábbi specifikus célokat tűztem ki:

1. UHPLC-SRM módszer fejlesztése aminosavak és biogén aminok vizsgálatára
2. A kifejlesztett módszer validálása és alkalmazása komplex biológiai minták vizsgálatára
3. UHPLC-SRM módszer fejlesztése Azatioprin metabolitok vizsgálatára
4. A kifejlesztett módszer validálása és alkalmazása klinikai minták vizsgálatára

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Felhasznált anyagok

Az aminosav és biogén aminosav analízis során vizsgált aminosav standardokat a Waters kft-től (alanin, arginin, aszparaginsav, glicin, glutaminsav, hisztamin, cisztein, lizin, szerin, prolin, treonin, tirozin, metionin, valin, leucin, izoleucin és fenilalanin) és a Merck Kft.-től (aszparagin, glutamin, taurin, hisztamin, etanolamin, metil-amin, etil-amin, citrullin, ornitin, putreszcín, kadaverin, tiramin, triptamin, 2-fenetil-amin) vásároltuk. A stabil izotóppal jelzett triptofánt a Cambridge Isotope Laboratories-től szereztük be. A derivatizációs reakciókhoz használt AccQ-Tag Ultra derivatizáló kitért, valamint a kromatográfiás elválasztáshoz használt AccQ-Tag Ultra A és B eluent a Waters Kft. szállította, míg az LC minőségű metanolt és vizet, valamint a mintaelőkészítéshez használt 3kDa-os Nanosept oszlopot a VWR Kft-től szereztük be.

Az azatioprin (AZA) metabolitok vizsgálata során használt LC minőségű acetonitrilt, metanolt és vizet a VWR Kft-től, a HPLC minőségű trifluor-ecetsavat, 6-tioguanint (6-TG), 5-bromouracilt és DL-ditiotreitolt (DTT) a Merck Kft-től szereztük be. A 6-metil-merkaptopurint (6-MMP) és a stabil izotóppal jelölt 6-tioguanin- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  (izotóp tisztaság 98 atom %  $^{13}\text{C}$ , 98 atom %  $^{15}\text{N}$ ) és 6-metil-merkaptopurin-D<sub>3</sub> (izotóp tisztaság 98 atom % D<sub>3</sub>) a Toronto Research Chemicals Inc-től vásároltuk.

#### 3.2. Mintagyűjtés

Az aminosavak és biogén aminosavak meghatározását szérumból és könnyűmintákban végeztük el. A kutatás során 5 egészséges donortól gyűjtöttünk szérumból és könnyűmintákat. A mintagyűjtés a Helsinki deklaráció elvei szerint történt a Debreceni Egyetem által kiállított etikai engedély alapján (DEOEC RKEB/IKEB 4701A-2016). A könnyűminták gyűjtését üvegkapilláris segítségével végeztük, (VWR Kft.) stimuláció és érzéstelenítés nélkül. Minden donor mindkét szeméből gyűjtöttünk könnyűmintákat.

Az AZA-tartalmú Imurannal (Aspen Pharma Trading Ltd.) kezelt AIH betegek vérmintáit a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Gasztroenterológiai Osztályának munkatársai bocsájtották rendelkezésünkre. A mintagyűjtés a Helsinki deklaráció elvei szerint történt a Debreceni Egyetem által kiállított etikai engedély alapján (12759-6/2019/EÜIG).

### **3.3. Standardok és minőségi kontroll (QC) minták készítése**

A vizsgálandó aminosavakból és biogén aminokból egy 2,5 mmol/L-es koncentrációjú törzsoldatot készítettünk (minden egyes vizsgált molekula koncentrációja 2,5 mmol/L volt), amint -20°C-on tároltunk. A minőségi ellenőrzésre (QC) szolgáló minták három különböző koncentrációban (2,5 µmol/L, 7,5 µmol/L és 15 µmol/L) készültek három különböző mátrixban (MilliQ víz, szérum és könny), amiket a későbbiekben a validációs kísérletekhez használtunk fel.

Az AZA metabolitok (6-TG és 6-MMP) standard oldatát a 6-TG és 6-TG\_SIL esetében metanol-2M NaOH-ban (3:7), míg a 6-MMP és 6-MMP\_SIL esetében tiszta metanolban készítettük el 1 mg/ml végkoncentrációban. Az egyedi oldatokat -20 °C-on tároltuk. A kalibrációs görbék elkészítése során az egyedi standard oldatok sorozathígításánál metanol-víz (3:7) oldószert használtunk. A QC mintákat egészséges önkéntesektől nyert szérum felhasználásával készítettük, az egyes analitokat 5 ng/ml, 20 ng/ml, 625 ng/ml és 1250 ng/ml végkoncentrációban tartalmazták, melyeket a későbbi validációs kísérletekhez használtunk fel.

### **3.4. AccQ-Tag derivatizálás**

Az aminosav és biogén amin analízishez használt standardok és biológiai minták derivatizálását AccQ-Tag Ultra derivatizációs kit (Waters) segítségével végeztük el a gyártó utasításaink megfelelően. 10 µl mintához 70 µl borát puffert (pH=8,8), majd 20 µl AccQ-Tag Ultra derivatizációs reagenst adtunk, majd a komponensek összekeverése után a mintát 1 percre inkubáltuk szobahőmérsékleten, amit egy 10 perces inkubálás követett 55 °C-on, amíg a 1.1.3.1 fejezetben tárgyalt reakciók lezajlottak.

### **3.5. Kromatográfias és tömegspektrometriás paraméterek**

Az LC-MS analíziseket Waters ACQUITY H-Class UHPLC folyadékkromatográfias rendszerrel (Waters) kapcsolt 5500 QTRAP (Sciex) tömegspektrometriás rendszeren végeztük. Az UHPLC készüléket az Empower 3 szoftvertrel (Waters), míg a tömegspektrométert az Analyst 1.6.3. verziójú szoftvertrel (Sciex) vezéreltük.

### 3.5.1. Aminosavak és biogén aminok vizsgálata

Az AccQ-Tag derivatizált minták kromatográfiás elválasztását AccQ-Tag Ultra C18 oszlopon (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm, Waters) végeztük, amely egy Acquity előtét oszloppal (0,2  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm, Waters) volt felszerelve. Az alkalmazott gradiens elúciós módszer hossza 11 perc volt, az áramlási sebesség 0,65 ml/perc, az alkalmazott oszlop hőmérséklet pedig 54 °C volt. A kromatográfiás elválasztáshoz négy különböző oldószer keveréket használtunk, az „A” oldószer 100% AccQ-Tag Ultra A eluens, a „B” oldószer 10% AccQ-Tag Ultra B eluens LC tisztaságú vízzel hígítva, a „C” oldószer 100% LC tisztaságú víz, a „D” oldószer pedig 100% AccQ-Tag Ultra B eluens volt. Az UHPLC-UV spektrumok detektálását PDA detektorral végeztem 260 nm hullámhosszon, 10 pont/másodperces adatgyűjtési sebességgel.

A kromatográfiás oszlopról érkező eluensek ionizálására elektroporlasztásos ionizációt (ESI) alkalmaztunk 5000 V feszültséggel. Az UHPLC-SRM spektrumok pozitív ion módban regisztráltuk. Az ionforrás gáz 1 értéke 30 psi, az ionforrás gáz 2 értéke 50 psi, a szárítógáz értéke 30 psi, az ionforrás hőmérséklete pedig 500 °C volt, a ciklus idő 0.5 másodperc, a ciklusok száma 1319. Az regisztrált UHPLC-UV spektrumokat az Empower 3 szoftverrel, míg az UHPLC-SRM spektrumokat Skyline szoftverrel értékeltük (verzió szám 23.1.0.455).

### 3.5.2. AZA metabolitok vizsgálata

A 6-TG és 6-MMP molekulák folyadékkromatográfiás elválasztását AccQ-tag Ultra C18 oszlopon (1,7  $\mu\text{m}$ ; 2,1  $\times$  100 mm, Waters) végeztük, amely előtt egy Acquity előtét oszlopot (0,2  $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm Waters) használtunk. A teljes analízis hossza, az ekvilibárlási idővel együtt 4 perc volt. Az elválasztás során alkalmazott áramlási sebesség 0,40 ml/perc az oszlop hőmérséklete 40 °C volt. Az „A” eluens 0,02 mol/l ammónium-formiát, 0,3% (v/v) hangyasavat tartalmazó vízben oldva (pH = 3,00), a „B” eluens pedig 100% acetonitril volt.

Az SRM alapú célzott MS-analízist elektropray ionizációval végeztük pozitív ion üzemmódban, 5500 V porlasztási feszültséggel. Az ionforrás hőmérsékletét 500 °C-ra, ionforrás gáz 1 értéke 30 psi, az ionforrás gáz 2 értéke 50 psi, a szárítógáz értéke 30 psi volt. Az alkalmazott deklaszter potenciál 100 eV volt, a fragmentációhoz pedig 40 eV ütközési energiát használtunk. Belső standardként a stabil izotópokkal jelölt 6-tioguanin-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N (6-

TG\_SIL) és 6-metil-merkaptopurin-D<sub>3</sub> (6-MMP\_SIL) vegyületeket használtuk. Az SRM-spektrumokat a Skyline szoftverrel (verzió szám 23.1.0.455) elemeztük.

### **3.6. LC-MS módszerek validálása**

#### **3.6.1. Aminosavak és biogén aminok vizsgálatára szolgáló módszer validálása**

A kifejlesztett módszert a Galba és munkatársai és Grey és munkatársai által alkalmazott, az FDA irányelveknek megfelelő módon validáltuk. A validálás során vizsgáltuk a linearitást, pontosságot, egy napon belüli és napok közötti variabilitást, mátrix hatást, a visszanyerést, a kimutatási határt (LOD), a kvantitálási határt (LOQ) és a stabilitást.

A linearitást 0,25-30 µmol/L-es koncentráció tartományban vizsgáltuk mind három mátrixban (MilliQ víz, szérum és könny). Mindhárom vizsgált mátrix esetén három párhuzamos analízist végeztünk, majd a kapott kalibrációs egyenesek segítségével meghatároztuk a kimutatási határt (LOD) és a kvantitálási határt (LOQ).

A három különböző koncentrációjú QC mintát mindhárom mátrixban elkészítettük majd mindnegyik mintát ötször analizáltuk és ezen eredményekből meghatároztuk a pontosságot, az egy napon belüli variabilitást, a mátrix hatást, a visszanyerést és a stabilitást. A napok közötti variabilitás számításához három egymást követő nap (naponta 5 mérés minden koncentrációból és mátrixból) mérési eredményeit használtuk fel. A visszanyerést a mért értékek és a néveleges értékek összevetésével számítottuk ki.

Az autosampler stabilitást úgy teszteltük, hogy a QC mintákat 12 órán keresztül 4°C a készülékben hagytuk, majd analizáltuk. A fagyasztási-olvasztási stabilitás meghatározásához a QC mintákat -70°C-on lefagyasztottuk, majd szobahőmérsékleten felolvasztottuk; ezt a fagyasztás-olvasztás ciklust pedig háromszor megismételtük. A stabilitást mind derivatizálás előtt, mind derivatizálás után fagyasztott mintákon megvizsgáltuk, az eredményeket pedig a frissen elkészített QC minták értékeihez hasonlítottuk.

#### **3.6.2. AZA metabolitok vizsgálatára szolgáló módszer validálása**

A kifejlesztett LC-MS módszert az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency- EMA) M10-es irányelve és gyógyszerekre vonatkozó nemzetközi szabályozásokat összehangoló ICH (International Council for Harmonisation) előírásai alapján validáltuk Yu és munkatársai, valamint Miao és munkatársai korábbi munkája alapján. Meghatároztuk a linearitást, a szelektivitást, a specificitást, a pontosságot és a

precizitást, az egy napon belüli és a napok közötti variabilitást, az átmosódást, a visszanyerést, a mátrixhatást, az alsó kvantitálási határt (LLOQ) és a felső kvantitálási határát (ULOQ).

A kalibrációs standardok ugyanabban a biológiai mátrixban készültek, mint a későbbiekben vizsgált klinikai minták. A vizsgált kalibrációs tartomány 2,5-5000 ng/ml volt, amit az Európai Gyógyszerügynökség iránymutatásainak megfelelően vizsgáltuk. A kritériumok szerint az LLOQ esetében a pontosság a névleges koncentráció  $\pm 20\%$ -án belül, míg az összes többi kalibrációs pont esetén  $\pm 15\%$ -os határon belül mozoghat és a kalibrációs pontok legalább  $75\%$ -ának teljesítenie kell a kritériumokat.

A szelektivitás meghatározásához olyan mátrix mintákat elemeztünk, ami nem tartalmazta a vizsgált vegyületeket és/vagy annak SIL verzióját. A kritérium szerint a vizsgált retencióknál nem lehetnek interferáló csúcsok.

A specificitás vizsgálatához 5-bromouracilt használtunk, amely egy purin nukleotid analógja a vizsgált molekuláknak. A kritérium alapján az 5-bromouracil nem zavarhatja a célmolekulák és SIL verziók meghatározását.

A pontosságot és precizitást 5, 20, 625 és 1250 ng/ml koncentrációjú QC minták elemzésével határoztuk meg. Az egy napon belüli és a napok közötti variabilitást a QC minták öt párhuzamos analiziséből határoztuk meg ugyanazon a napon és még két további napon keresztül.

A rendszer átmosódását a kalibrációs görbék ULOQ értékét követő mátrix minták elemzésével vizsgáltuk.

A mátrix hatását hat különböző mátrixból származó alacsony (20 ng/ml) és magas (1250 ng/ml) koncentrációjú QC analizisével vizsgáltuk három párhuzamost alkalmazva. Az EMA kritérium alapján a pontosság és a variációs együttható nem lehet több mint  $15\%$ .

A minták fagyasztási-olvasztási stabilitását a QC minták elemzésével vizsgáltuk három fagyasztás-olvasztás ciklus után  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az EMA kritériumok alapján az alacsony és magas koncentrációjú QC mintákat (20 ng/ml, illetve 1250 ng/ml) a vizsgálandó klinikai mintákkal azonos módon kell kezelni. A QC mintákat a fagyasztás-olvasztási ciklusok között legalább 12 órán át fagyasztva kell tartani és a stabilitás vizsgálatokat frissen készített kalibrációs standardok és QC-k felhasználásával kell elvégezni. A vizsgált molekulák hosszú távú stabilitását  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 hétig tárolt mátrixban vizsgáltuk.

A 6-TG és 6-MMP valamint a belső standardok törzsadatainak és munkaadatainak stabilitását a vizsgálati minták elemzéséhez használt tárolási körülmények között határoztuk meg az oldatok legalacsonyabb és legmagasabb koncentrációjának felhasználásával.

Meghatároztuk a feldolgozott minták stabilitását is, beleértve az elemzés befejezéséig eltelt időt, valamint az autosampler stabilitást is, illetve az ismételt analízisek reprodukálhatóságát is vizsgáltuk.

### **3.7. Szérum és könny minták aminosav és biogén amin tartalmának analízise**

A vizsgálatokhoz gyűjtött könnymintákból 3-3 µl mennyiséget MilliQ vízzel 50 µl-re egészítettünk ki, majd Nanosept3K szűrőn (VWR Kft.) centrifugáltuk, hogy a vizsgálandó komponenseket elválasszuk a fehérjéktől és a nagyobb molekula tömegű vegyületektől. A centrifugálást 2x10 percig 16000 g-n végeztük 4°C-on, majd a szűrletet vákuum koncentrátorban (Thermo Scientific) beszárítottuk 80 µl borát pufferben történő feloldás után elvégeztük az 3.4 fejezetben ismeretett AccQ-Tag derivatizálási reakciót.

A szérum mintákból 100 µl-t szűrtünk át Nanosept3K szűrőn és hasonlóan a könnyminták előkészítéséhez 2x10 percig 16000 g-n 4°C-on centrifugáltuk. Az AccQ-Tag derivatizálást 10 µl szűrletből végeztük el.

Az így előkészített könnymintákat hígítás nélkül, míg a szérum mintákat hígítás nélkül és tízszeres hígításban is analizáltuk. A kromatográfiás oszlopra felvitt térfogat minden esetben 1µl volt, a számított aminosav koncentráció értékek az eredeti mintákra vonatkoztak.

### **3.8. AZA metabolitok vizsgálata AIH-s betegek vérmintáiban**

Az EDTA-val kezelt csőbe gyűjtött vérmintákat kétszeres térfogatú UPLC minőségű vízzel 1 percig keverve lizáltuk. Ezután 200 µL lizátumhoz 100 µL SIL molekula keveréket (0,2 µg/ml minden egyes vegyület esetében) és 150 µL (vízben feloldva 0,1 mol/l koncentrációban) DTT-t adtunk, majd a fehérjéket 40 µL 100%-os trifluorecetsavval 1 percig történő kevertetés során kicsaptuk. A mintákat 15 percen keresztül 16100 g-vel centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd 2 × 200 µL felülűszót egy új csőbe pipettáztunk és 45 percig 100 °C-on inkubáltuk, majd ismét 15 percig 16100 g-vel centrifugáltuk. Ezt követően 200 µL felülűszót egy új csőbe pipettáztunk, és megismételtük az előző centrifugálási lépést. A tiszta felülűszóból 100 µL térfogatot pipettáztunk a mintatartókba, melyekből 5 µL-t injektáljuk az UPLC rendszerre. A 6-TGN-eket a savas körülmények között történő melegítéssel 6-TG-vé hidrolizáltuk, és a 6-TGN koncentrációját a 6-TG szintjének elemzésével határoztuk meg. A 6-TG és a 6-MMP koncentrációját ng/ml

egységben adtuk meg, a 6-TGN és a 6-MMPr koncentrációját pedig a vörösvérsejtszámra történő normalizálással számoltuk ki.

## **4. Eredmények**

Munkánk során az emberi szervezetben endogén módon megtalálható aminosavak és biogén aminok, valamint Azatioprin metabolit xenobiotikumok célzott tömegspektrometriás vizsgálatát végeztük el, mely magába foglalta a módszerek fejlesztését, validálását és alkalmazását biológiai mintákon.

### **4.1. UHPLC-MS módszerfejlesztés aminosavak és biogén aminok vizsgálatára**

Mivel az aminosavak és biogén aminok mennyiségi változása kóros elváltozásokat jelezhet az emberi szervezetben, kifejlesztettünk egy a vizsgálatukra alkalmas gyors UHPLC-MS módszert. A 33 cél molekula vizsgálatára a 1.1.3.1 fejezetben részletezett AccQ-Tag derivatizációs technikát alkalmaztuk, melyet UHPLC-MS analízis követett.

#### **4.1.1. Tömegspektrometriás paraméterek meghatározása**

Mivel a mintaelőkészítés során használt derivatizálási reakció tömegkülönbséget eredményez a vizsgálandó molekulákon, a tömegspektrometriás analízis előtt szükséges volt meghatározni a prekursor ionok  $m/z$  értékét. A hisztidin, ornitin, citrullin és egyes biogén aminok esetében egynél több szabad aminocsoport is megtalálható a molekulában, így megvizsgáltuk a többszörös derivatizálódás lehetőségét is.

A tömegspektrometriás vizsgálatok alapján a citrullin, hisztidin, hisztamin és triptamin esetében egy amino csoport esetében volt megfigyelhető a származékképzés, míg a kadaverin, ornitin, és putreszcin esetében két amino csoport származékképzése volt azonosítható. A szerotonin esetében egyszeres és kétszeres módosítás is azonosítható volt, azonban a kétszeresen módosított forma sokkal alacsonyabb intenzitással jelentkezett az egyszereshez képest analízisek során. Mivel az egyszeresen és kétszeresen származékolt molekulák közötti arány állandó volt, a további analízisek során a kétszeresen módosított forma értékeit használtuk a módszerfajl elkészítéséhez. A származékolt molekulák fragmentációs analízisének elvégzése után létrehoztuk a kiválasztott ionátmenetek vizsgálatára alkalmas SRM módszerfajlt.

#### 4.1.2. UHPLC-UV-MS módszerfejlesztés

A módszert egy 5500 QTRAP tandem tömegspektrométerrel összekapcsolt Acquity H-Class UHPLC-rendszeren fejlesztettük ki. A kromatográfiás elúciós profilt optimalizáltuk, melynek eredményeként egy a 33 aminosav és biogén amin elválasztására alkalmas 11 perces gradienst hoztunk létre. A derivatizált molekulákat 260 nm-es hullámhosszon fotodiódasoros (PDA) detektorral és az 5500 QTRAP tömegspektrométerrel SRM üzemmódban detektáltuk. Az optimalizált kromatográfiás paraméterek alkalmazásával a derivatizált molekulák elválasztása a triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével sikeres volt, viszont a tömegkülönbség miatt az egyedi analízisük az SRM módszerrel elvégezhető volt.

#### 4.1.3. UHPLC-UV-MS módszer validáció

A kifejlesztett módszert az FDA iránymutatásainak megfelelően validáltuk, Galba és munkatársai, valamint Grey és munkatársai munkája alapján. A kalibrációs tartományt három különféle mátrixban, MilliQ vízben, szérumban és könnyben 0,25-30  $\mu\text{mol/l}$  koncentráció vizsgáltuk, melyek alapján meghatároztuk a kimutatási határt (LOD) és a kvantitálási határt (LOQ) is.

Az UV-detektorral regisztrált adatok estében a kimutatási határok (LOD) a következők szerint alakultak: MilliQ vízben 0,108-2,023  $\mu\text{mol/l}$ , szérumban 0,097-2,304  $\mu\text{mol/l}$ , könny mátrixban pedig 0,124-1,372  $\mu\text{mol/l}$  tartomány figyelhető meg. A kvantitálási határok esetében magasabb koncentrációk voltak megfigyelhetők: MilliQ vízben 0,361-6,743  $\mu\text{mol/l}$ , szérumban 0,325-7,679  $\mu\text{mol/l}$ , könny mátrixban pedig 0,412-5,575  $\mu\text{mol/l}$ . A lineáris kalibrációs tartomány MilliQ vízben mátrixban 1-20  $\mu\text{mol/l}$  közötti része minden vizsgált molekula estében megfigyelhető, szérumban mátrixban ez a tartomány módosul 2,5-25  $\mu\text{mol/l}$ -re, könny mátrixban pedig 1-15  $\mu\text{mol/l}$ -re.

Az SRM analízis eredményei alapján meghatározott kimutatási határok a következők szerint alakultak: MilliQ vízben 0,021-1,042  $\mu\text{mol/l}$ , szérumban 0,025-0,858  $\mu\text{mol/l}$ , könnyben 0,038-1,574  $\mu\text{mol/l}$  tartomány figyelhető meg. A kvantitálási határok esetében itt is magasabb koncentrációk voltak megfigyelhetők: MilliQ vízben 0,071-3,472  $\mu\text{mol/l}$ , szérumban 0,083-2,86  $\mu\text{mol/l}$ , könnyben 0,127-5,247  $\mu\text{mol/l}$ . A lineáris kalibrációs tartomány 0,25-1  $\mu\text{mol/l}$  közötti része minden vizsgált molekula estében megfigyelhető. A biogén aminok esetében jellemzően kis koncentrációban volt lineáris összefüggés a görbe

alatti terület és a koncentráció között, az aminosavak esetében viszont tágabb 0,25-20  $\mu\text{mol/l}$  közötti tartomány volt jellemző.

Az UHPLC-UV és az SRM analízissel regisztrált eredmények összehasonlítása azt mutatta, hogy míg a triptamin és a 2-fenetil-amin egyedi analízise SRM analízissel is elvégezhető, a számított lineáris dinamikai tartományok szélesebbek voltak az UHPLC-UV analízis esetében az SRM-hez képest. Az adatok alapján úgy döntöttünk, hogy az UHPLC-UV analízist használjuk a derivatizált aminosavak és biogén aminok mennyiségi meghatározására és a kifejlesztett módszer további validálására. Az SRM-analízist a kromatográfiai csúcsok megerősítésére, valamint az együttesen jelen lévő triptamin és 2-fenetil-amin minőségi és mennyiségi elemzésére alkalmaztuk.

A kifejlesztett módszer validálásához MilliQ víz, szérum és könny mátrixokban QC mintákat hoztunk létre, melyek 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , 7,5  $\mu\text{mol/l}$  és 15  $\mu\text{mol/l}$  koncentrációban tartalmazták a vizsgált analitokat. A minták analízisével meghatároztuk az egy napon belüli és napok közötti variabilitást, pontosságát és precizitását. A 33 derivatizált molekula esetében a pontosság 85,66% és 114,41% között mozgott MilliQ vízben, 90,92% és 114,12% között szérum mátrixban és 91,39% és 114,80% között könny mátrixban. Az egy napon belüli és a napok közötti variabilitást és pontosság MilliQ vízben és a könny mátrixban 15% alattinak, míg szérum mátrixban pedig 9% alattinak bizonyult. A QC-minták elemzése során kapott adatokból számított visszanyerés 85%-nál magasabb volt. A mátrixhatás vizsgálata során jelentős interferenciát tapasztaltunk. Szérum mátrix esetében 15% feletti volt a mátrixhatás a hisztidin, a glutamin, az arginin, a hisztamin, a szerotonin, a triptofán, a triptamin és a 2-fenetil-amin esetében, jellemzően az alacsony koncentráció esetében. A könny mátrix esetében a lizin, a tirozin, a valin, a kadaverin és a triptofán esetében figyeltünk meg 15%-ot meghaladó mátrixhatást. A molekulák stabilitását különböző körülmények között vizsgáltuk. Vizsgáltuk a stabilitásukat az autosamplerben, valamint derivatizálás előtti és derivatizálás utáni fagyasztási-olvasztási ciklusok során is. Adatainkat figyelembe véve arra a következtetésre jutottunk, hogy a mintákat nem szabad 12 óránál hosszabb ideig az autosamplerben tárolni, és a fagyasztási-olvasztási ciklusokat is kerülni kell a pontos mennyiségi meghatározás érdekében.

#### **4.2. Szérum és könny minták aminosav és biogén amin tartalmának meghatározása**

A validált módszer segítségével meghatároztuk a kiválasztott aminosavak és biogén aminok koncentrációját egészséges önkéntesektől gyűjtött szérum- és könnymintákban. A

mintagyűjtést követően a szérum és a könnymintákat 3 kDa-os spin oszlopokon tisztítottuk és AccQ-tag derivatizálásnak vetettük alá. A mintaelőkészítés során fellépő lehetséges veszteség meghatározásához megvizsgáltuk az aminosav és biogén amin standard keveréket tisztítás nélkül és tisztítás után. A tisztított és nem tisztított minták csúcsterületei között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az öt egészséges önkéntestől származó szérum mintákat derivatizáltuk, a validált módszerrel elemeztük, és kiszámítottuk a molekulák koncentrációját az eredeti mintatérfogatra vonatkoztatva.

Az 5 egészséges önkéntesből gyűjtött szérum mintában a hisztamin, a tiramin, a triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével valamennyi derivatizált aminosavat és biogén aminot azonosítani tudtuk. Az etil-amint UHPLC-UV analízissel kimutattuk a szérum mintákban, de a koncentráció a kvantitálási határérték alatt volt, míg a metil-amint csak SRM analízissel tudtuk kimutatni.

Az eredmények alapján a glutamin, az alanin és a glicin volt jelen a legnagyobb koncentrációban, míg a szerin, treonin, prolin, cisztein, lizin, valin és leucin koncentrációja 100  $\mu\text{mol/l}$ -nél magasabban bizonyult. A vizsgált biogén aminok szintje jelentősen alacsonyabb volt a szérumban, mint a proteinogén és nem-proteinogén aminosavaké.

Ugyanezen 5 egészséges önkéntestől könnymintákat is gyűjtöttünk. A mintagyűjtés során mindkét szemből megkíséreltük a könny gyűjtését, azonban ez nem minden esetben volt lehetséges, így összesen 8 könnyminta analízisét végeztük el, melyeket egyedi mintaként tekintettük. A derivatizálás és elemzés után a vizsgált molekulák a szerotonin, putreszcin, triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével azonosíthatók voltak a mintákban.

Az etanolamin, etilamin, metionin, kadaverin, tiramin, leucin és fenilalanin UHPLC-UV analízissel kimutatható volt a könnymintákban, azonban a koncentrációjuk a kvantitálási határérték alá esett. A metilamint csak SRM analízissel tudtuk kimutatni.

A validált módszerrel 17 proteinogén és 2 nem-proteinogén aminosav és a taurin mennyiségi meghatározása volt lehetséges. A szérumminták elemzése során kapott eredményekhez hasonlóan a biogén aminok koncentrációja a könnyben is alacsonyabb volt az aminosavakhoz képest. Eredményeink alapján a vizsgált biomolekulák közül a szerin koncentrációja a legmagasabb a könnyben.

### **4.3. UHPLC-MS módszerfejlesztés Azatioprin metabolitok vizsgálatára**

Az AZA metabolitok koncentrációjának nyomon követése fontos információval szolgálhat az AIH-s betegek terápiája során, ezért kifejlesztettünk egy SRM-alapú LC-MS módszert a 6-TG és a 6-MMP azonosítására és mennyiségi meghatározására.

#### **4.3.1. Tömegspektrometriás paraméterek meghatározása**

Az aminosav és biogén amin analízishez hasonlóan a módszerfejlesztés kezdetén meghatároztuk az SRM módszerfájlhoz szükséges paramétereket standard molekulák segítségével. Az analízishez stabil izotóppal jelölt (SIL) standardokat is felhasználtunk.

#### **4.3.2. UHPLC-MS módszerfejlesztés**

A módszert egy Acquity H-Class UHPLC készülékhez (Waters) kapcsolt 5500QTRAP tandem tömegspektrometriás (Sciex) rendszeren fejlesztettük ki. Optimalizáltunk egy megfelelő kromatográfiás elúciós profilt optimalizáltuk, és egy gyors, 4 perces gradienst hoztunk létre. A SIL standardokat minőségi kontrollként és a pontos mennyiségi meghatározás érdekében használtunk. Az alkalmazott SRM-átmenetek specifikusak voltak a célmolekulákra, ennek megfelelően a célmolekulák és szintetikus megfelelőik azonosítása sikeresen megtörtént. A mért retenciós idők 0,73 perc (6-TG és 6-TG\_SIL) és 1,66 perc (6-MMP és 6-MMP\_SIL) voltak.

#### **4.3.3. UHPLC-MS módszer validáció**

A kifejlesztett LC-MS módszert az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) iránymutatásai szerint validáltuk, melynek során vizsgáltuk a módszer szelektivitását, specificitását, az átmosódást, a lineáris tartományt, az alsó kvantitálás határt (LLOQ), a felső kvantitálási határt (ULOQ), a pontosságot, a precizitást, a visszanyerést, a mátrixhatást és a stabilitást.

A módszer érzékenységének és kalibrációs tartományának meghatározásához a mátrixot egészséges önkéntesektől gyűjtött vérmintákból állítottuk elő. Mindkét vizsgált molekula esetén 2,5-2500 ng/ml koncentráció tartományban vizsgáltuk a linearitást az elkészített mátrixban. A kalibrációs görbe, az LLOQ és az ULOQ meghatározásához a lineáris tartományt három független kísérlet során, két ismétlésben, három napon keresztül vizsgáltuk. A regisztrált adatok felhasználásával lineáris regresszió analízist végeztünk logaritmikus skálák alkalmazásával. Az elemzés során a 6-TG esetében  $y = 0,0073 \cdot x +$

0,0042 ( $R^2 = 1$ ), míg a 6-MMP esetében  $y = 0,0087 \cdot x - 0,0035$  ( $R^2 = 0,9993$ ) egyenleteket kaptuk. Az LLOQ 5 ng/ml-nek, míg az ULOQ 1250 ng/ml-nek bizonyult mindkét vizsgált molekula esetében.

A rendszer szelektivitásának és átmosódásának meghatározásához hat egyedi mátrix mintát (analit és SIL nélküli) használtunk. Az LLOQ analit válaszai a 6-TG esetében 7,60 %, a 6-MMP esetében 2,31 % voltak, míg az SIL válaszok alacsonyabbak voltak. Az átmosódás vizsgálata során a 6-TG és 6-MMP válaszai az ULOQ után 10,37 % és 3,28 %, míg az SIL válaszok 1,09 % és 0,01 % voltak. A specificitást 100 ng/ml 5-bromouracil alkalmazásával teszteltük, és az analit válaszok 5,17 % és 1,48 % voltak.

A pontosságot, precizitást és visszanyerést napon belül és napok között is vizsgáltuk. Az eredmények szerint a pontosság és a precizitás minden koncentrációnál 15%-on belül maradt. A mátrixhatást alacsony (20 ng/ml) és magas (1250 ng/ml) koncentrációnál vizsgáltuk, és a pontosság, visszanyerés és mátrixhatás a névleges koncentráció 15%-ánál kisebb volt.

A stabilitást fagyasztás-olvasztási, hosszú távú (10 hét) és munkaoldat tesztekkel vizsgáltuk,  $-20^\circ\text{C}$ -on tárolva. A minta stabilitást közvetlenül a mintaelőkészítés után és hat óras autosampler tárolás után elemeztük. Az ismételt injektálási reprodukálhatóságot alacsony, közepes és magas koncentrációjú QC minták öt párhuzamos injektálásával teszteltük. A 6-TG esetében a visszanyerés 15%-on belül maradt, míg a 6-MMP-nél a különbségek 25% és 60% között mozogtak, a legjobb visszanyerést 20 ng/ml koncentrációnál tapasztaltuk.

#### **4.4. AZA metabolitok koncentrációjának meghatározása AIH-ban szenvedő betegek vérmintáiban**

Hogy bizonyítsuk a validált módszer használhatóságát klinikai minták elemzésére, megvizsgáltuk a 6-TG és 6-MMP mennyiségét AIH-ban szenvedő betegek vérmintáiban. A betegek különböző dózisú AZA (Imuran) kezelést kaptak. A terápiás hatékonyság szempontjából fontos 6-TGN és MMP<sub>r</sub> koncentrációkat a 6-TG és 6-MMP koncentrációjának vörösvértest számra történő normalizálásával számoltuk ki.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a validált módszer segítségével meghatározott metabolit koncentráció arányos az alkalmazott terápiás dózissal.

## 5. Diszkusszió

A metabolomikai vizsgálatok kulcsszerepet játszanak az endogén molekulák és xenobiotikumok analízisében, mivel képesek átfogó képet adni a biológiai rendszerek kémiai összetételéről. Az endogén molekulák, mint például a metabolitok, információt nyújtanak a sejtek és szövetek állapotáról, míg a xenobiotikumok, mint a gyógyszerek, toxikus anyagok vagy környezeti szennyezők, hatással lehetnek a metabolikus hálózatokra. A metabolomika lehetővé teszi a molekuláris interakciók, biokémiai utak és fiziológiai válaszok feltérképezését, ami elengedhetetlen a betegségek mechanizmusainak megértésében, a biomarkerek azonosításában, valamint a gyógyszerfejlesztésben és a toxicitás előrejelzésében. Az LC-MS analízis különösen fontos eszköze ennek a területnek, mivel képes a metabolitokat és valamint a xenobiotikumokat érzékenyen és specifikus vizsgálatára. Az LC-MS technika kombinálja a kromatográfia előnyeit a tömegspektrometriával, amelyek lehetővé teszik a vegyületek elválasztását valamint a molekulák azonosítását és kvantitálását. Ez a módszer különösen hasznos a metabolikus hálózatok megértésében, a gyógyszerek hatásainak és toxicitásának vizsgálatában, valamint a betegségek mechanizmusainak feltárásában.

A kutatás során célom célzott LC-MS módszerek tervezése, validálása és alkalmazása volt biológiai mintákon.

### 5.1. Aminosavak és biogén aminok meghatározása

Kifejlesztettünk egy LC-MS módszert szérum és könnyeminták aminosav és biogén amin tartalmának vizsgálatára, melyet az FDA iránymutatásainak megfelelően validáltunk. A validációs kísérletek eredményeiből megállapítottuk, hogy a módszer megfelelő érzékenységgű és széles dinamikus tartománnyal rendelkezik, amely alkalmassá teszi komplex biológiai minták elemzésére. Az UV- és SRM alapú detektálás eredményeit összehasonlítva arra a következtetésre jutottunk, hogy az UV detektálás szélesebb dinamikus tartománnyal rendelkezik, ezért a célmolekulák kvantitálására ezt a detektálási módot használtuk. Az SRM-analízist a kromatográfiai csúcsok megerősítésére, valamint az együttesen jelen lévő triptamin és 2-fenetil-amin minőségi és mennyiségi elemzésére alkalmaztuk. A variabilitás, pontosság és precizitás vizsgálata során az eredmények az FDA kritériumoknak megfelelően  $\pm 15\%$ -nál kisebb eltérést mutattak. Jelentős mátrix hatást azonosítottunk a vizsgálataink során, így ezen módszer használata során a kalibrációs görbéket célszerű az alkalmazott mátrixban elkészíteni a megfelelő kvantitálás érdekében.

A stabilitási vizsgálatok alapján elmondható, hogy kerülni kell a minták hosszú távú tárolását és az ismételt fagyasztás-olvasztás ciklusokat.

Az emberi testfolyadékok közül a szérum a legszélesebb körben alkalmazott biológiai minta az orvostudományban, különösen a kóros elváltozások diagnosztizálásában és az alkalmazott terápiák monitorozásában. A szérum fehérjékben és metabolitokban gazdag, és minimálisan invazív módon nyerhető minta, így kiemelt jelentőséget kap a biomarker kutatásokban. A validált módszer segítségével megvizsgáltuk öt egészséges önkéntes szérum mintáját. A hisztamin, a tiramin, a triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével minden célmolekulát sikerült azonosítanunk és az etil-amin és metil-amin kivételével a kvantitálásuk is lehetséges volt. Az eredmények alapján a szérumban a glutamin és az alanin koncentrációja a legmagasabb, amely összhangban van a tudományos irodalommal. A főbb nitrogén transzporterek mellett a szerin, glicin, treonin, prolin, lizin, valin és leucin koncentrációja 100  $\mu\text{mol/l}$ -nél nagyobbak bizonyult. A vizsgált biogén aminok szintje jelentősen alacsonyabb volt a szérumban, mint a proteinogén és nem-proteinogén aminosavaké.

A szérum aminosav profiljában bekövetkező változások monitorozásának fontos szerepe van mind a biológiai mind pedig az orvostudományokban, mivel az aminosavak fontos szerepet töltenek be a szervezet homeosztatisz folyamatában és bizonyos betegségek patogenezisében is. Összefüggést találtak a szérum glicin koncentráció és az inzulinrezisztencia, valamint a metabolikus szindróma között. Az elágazó láncú aminosavak, mint a valin, leucin és izoleucin emelkedett mennyiségét azonosították juharszirup betegségben, míg jelentős csökkenésüket mutatták ki az elágazó láncú ketosav-dehidrogenáz-kináz hiány okozta autizmus esetében. Az aminosavak mellett a biogén aminok is fontos szerepet játszanak a homeosztatisz és patológiás folyamatokban. Az etanolamin, mint a plazmalogének alkotóeleme szerepet játszhat, neurológiai problémák, például az Alzheimer-kór kialakulásában. A poliaminok, mint például a putreszin és a kadaverin különböző funkciókat töltenek be az emberi szervezetben, és jelentős szerepük van olyan kóros állapotokban, mint a krónikus veseelégtelenség vagy az autoimmun pajzsmirigybetegségek. Ezen kívül a kadaverint az emlőrák kialakulásának szabályozójaként is azonosították.

Bár a különböző patológiás elváltozások diagnosztizálásához leggyakrabban szérum mintákat vizsgálnak, a könny is jelentős orvostudományi relevanciával bír. A könny fehérjetartalmának változását több lokális és szisztémás patológiás elváltozással is összefüggésbe hozták, így fontos szerepet játszik biomarker kutatásokban. A könnyminták

vizsgálatának további előnye a nem invazív és viszonylag egyszerű mintavételei mód. Az ugyanazon öt egészséges egyéntől gyűjtött könny analízise során a szerotonin, a triptamin, putreszcín és a 2-fenetil-amin kivételével minden célmolekula azonosítása sikeres volt. Az etanolamin, etilamin, metilamin, metionin, kadaverin, tiramin, leucin és fenilalanin kivételével a vizsgált molekulák kvantitatív meghatározása is lehetséges volt. A szérumminták elemzése során kapott eredményekhez hasonlóan a könnyekben a biogén aminok koncentrációja alacsonyabb volt, mint az aminosavaké. Továbbá kimutattuk, hogy a vizsgált aminosavak és biogén aminok eltérő koncentrációban fordulnak elő a könnyben és a szérumban. Bár értékes biomarker forrásként szolgál, a könny metabolit profiljában bekövetkező változásokat nem vizsgálták olyan behatóan, mint a szérum esetében. Több tanulmány során is megfigyelték a könny metabolit profiljának változását keratoconus, keratitis és száraz szem szindróma esetében, azonban a könnyben található aminosavak és biogén aminok jelentőségéről csak korlátozott információ áll rendelkezésre a szakirodalomban. ChenZhuo és munkatársai kimutatták, hogy az alanin, aszpartát és taurin szintje szignifikánsan magasabb volt a száraz szem szindrómában szenvedő betegek könnyében, mint az egészséges kontrollokéban. Nakatsukasa és munkatársai munkája alapján az arginin, metionin és taurin mennyisége csökkenést mutatott, míg az ornitin, lizin és treonin mennyisége növekedést mutatott szemfelszíni betegségekben.

Bár a tudományos irodalomban elérhető információ mennyisége korlátozott, a rendelkezésre álló tanulmányokból kiderül, hogy a könny aminosav- és biogén amin profiljának elemzése értékes információkkal szolgálhat a különböző patológiás elváltozásokra jellemző molekuláris változásokról.

## **5.2. Azatioprin metabolitok meghatározása**

Az aminosavak és biogén aminok vizsgálatát lehetővé tevő módszer mellett kifejlesztettünk egy Azatioprin metabolitok kvantálására alkalmas célzott tömegspektrometriás módszert is, melyet az Európai Gyógyszerügynökség irányelvei szerint validáltunk. A validációs kísérletek eredményeiből megállapítottuk, hogy a módszer megfelelő érzékenységgű és specificitású, minden vizsgált paraméter megfelelt az EMA által támogatott kritériumoknak. A kalibrációs pontok esetében az LLOQ-érték esetében a névleges koncentráció 20 %-ánál kisebb, az összes többi pont esetében pedig 15 %-nál kisebb eltérést tapasztaltunk. A szelektivitás, specificitás és átmosódás vizsgálata során az eredményeink 20% és 5% alatti eltérést mutattak az analit és belső standard válaszok

tekintetében, a pontosság, precizitás és visszanyerési vizsgálatok során pedig az eltérések a névleges koncentráció 15%-ánál kisebbnek bizonyultak. A mátrix hatás vizsgálata során az aminosav és biogén amin vizsgálati módszerhez képest sokkal alacsonyabb zavaró hatást detektáltunk. Bár a stabilitás vizsgálatok során alkalmazott három fagyasztási-olvasztási ciklus nem változtatta meg a célmolekulák koncentrációját, a -20 °C-on tárolt minták koncentrációja a vizsgált 10 hetes időtartam alatt jelentősen csökkent. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a minták hosszú távú tárolását kerülni kell. Az autosampler történő 6 órás expozíció nem változtatta meg jelentősen a molekulák koncentrációját, azonban a minták újbóli injektálásának reprodukálhatósági vizsgálata során sokkal nagyobb eltéréseket tapasztaltunk, különösen az alacsony koncentrációk és a 6-MMP esetében. A validált módszerrel megvizsgáltunk különböző AZA (Imuran) dózissal kezelt betegektől származó vérmintákat és meghatároztuk a 6-TG és 6-MMP koncentrációját, valamint a vörösvértest számra történő normlizálással a 6-TGN és 6-MMPr mennyiségét. Az adataink alapján elmondható volt, hogy a validált módszer segítségével meghatározott metabolit koncentráció értékek összhangban vannak a gyógyszer dóziséval.

Az AZA metabolitok koncentrációjának monitorozása a kezelés során fontos szereppel bír a gyógyszer toxicitás megelőzése szempontjából. Összefüggést mutattak ki a magas 6-MMPr szintje és a hepatotoxicitás között; amennyiben a 6-MMPr koncentráció meghaladja az  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  VVT értéket, háromszorosára növekszik a hepatotoxicitás kockázata. Emellett a 6-TGN szint vizsgálata hasznos lehet azon betegek esetében, akik az optimálisan beállított AZA/6-merkaptopurin dózis ellenére sem reagálnak a terápiára.

Yu és munkatársai nemrégiben publikáltak egy UPLC-UV módszert a 6-TG és a 6-MMP vizsgálatára vörösvértestekben. Bár módszerük hasznosnak bizonyult az AZA metabolitok elemzésére, az általunk kifejlesztett és validált módszer célzott tömegspektrometriás technikát és stabil izotóppal jelzett standardokat használ, ami nagyobb pontosságot és szelektivitást biztosít. Bár a módszerünk lineáris dinamikus tartománya kissé szűkebb, mint a Yu és munkatársai által kifejlesztett módszeré, azonban az MS-analízis nagyobb érzékenysége miatt az LLOQ érték mindkét molekula esetében alacsonyabb. Az MS-alapú azonosítás nagy szelektivitást biztosít, ami lehetővé teszi a potenciális zavaró ágensek kiszűrését. A munkacsoportunk által kifejlesztett UHPLC-MS módszer alkalmas az alacsony AZA metabolit koncentrációjával rendelkező betegek vérmintáinak megbízható vizsgálatára.

### 5.3 A vizsgálatok korlátai

Munkánk első részében egy gyors, érzékeny, validált SRM analízissel kombinált UHPLC-UV módszert fejlesztettünk, ami alkalmas a 33 AccQ-Tag-derivatizált aminosav és biogén amin egyidejű vizsgálatára. Bár a validált módszer jól használható a vizsgált testfolyadékok elemzésére, a mintavétel és a minta előkészítése kihívást jelenthet. Eredményeink azt mutatták, hogy a minta előkészítése során kerülni kell a fagyasztási-olvasztási ciklusokat, ezért a minták tárolását és felhasználását a legnagyobb körültekintéssel kell végezni. További korlátot jelenthet a minták egyedi variabilitása és a bazális könnyminták alacsony gyűjthető mennyisége. A könnytermelés sebessége egyénenként jelentős eltéréseket mutat, és sok esetben a könnyminta gyűjtés nem lehetséges. A módszerünk 3 µl könnymintát igényel, ezért az alacsony könnytermelési rátával rendelkező alanyok nem vonhatók be a vizsgálatokba. Kimutattuk, hogy a könnyek aminosavtartalma nem csak az egyének között, hanem a bal és a jobb szem között is nagymértékű változékonyságot mutat. A könnyminta gyűjtés során célszerű, ha ugyanaz a személy végzi a mintagyűjtést, a technikai eltérések minimalizálása érdekében, de az egyéni különbségek a könnyek összetételében továbbra is problémát jelenthetnek. A bemutatott módszert a vizsgált két testfolyadékon kívül más, orvosi szempontból fontos testfolyadékok, például nyál és verejték elemzésére is tovább lehet optimalizálni. További korlátot jelentett, hogy a biogén aminok koncentrációja többnyire a kvantitálási határ alá esett. Míg egészséges körülmények között a biogén aminok koncentrációja alacsony a testfolyadékokban, addig a kóros elváltozások, például a cukorbetegség, számos molekula, például a putreszcin és hisztamin koncentrációját megnövelhetik.

Munkánk második részében kifejlesztettünk és validáltunk egy célzott tömegspektrometriás módszert két AZA metabolit, a 6-TG és 6-MMP mennyiségének vizsgálatára. Bár a módszer jól használhatónak bizonyult a klinikai minták elemzése során, vizsgálatunk egyik limitáló tényezője, hogy csak ezen két AZA-metabolitra összpontosítottunk, más potenciális metabolitok, mint például a 6-tioinozinsav, vagy potenciális toxikus származékok, mint például a 6-tioinozin-monofoszfát elemzésére nem került sor. Egy másik limitáló tényezőt az alkalmazott analitikai rendszer, amelynek üzemeltetésére csak megfelelően kiképzett személyzet képes. Azonban a tömegspektrométerek által biztosított szelektivitás, amely lehetővé teszi a célmolekulák megkülönböztetését a potenciálisan interferáló anyagoktól, szükségessé teszi az alkalmazásukat, különösen olyan esetekben, amikor fontos terápiás változtatásokkal kapcsolatos döntéseket kell hozni.

## 6. Összefoglalás

A kutatás során célunk humán testfolyadék minták elemzésére alkalmas metabolomikai módszerek fejlesztése volt, melyek hiánypótlóak a klinikai kutatásokban. Az aminosavak és biogén aminok elemzése fontos információval szolgálhat az orvostudományokban, ám legjobb tudomásunk szerint jelenleg nincs olyan validált analitikai módszer amely alkalmas ezen molekulák egyidejű vizsgálatára. Ezért kifejlesztettünk és az FDA irányelvek szerint validáltunk egy UHPLC-MS módszert, ami alkalmas 33 aminosav és biogén amin egyidejű gyors analizésére komplex biológiai mintákból. A validált módszert szérumszám- és könnyemintákon teszteltük, bizonyítva a módszer megbízhatóságát és alkalmazhatóságát klinikai szempontból releváns mintákon. Az egészséges önkéntesektől gyűjtött minták analizéséből származó eredmények összhangban állnak a tudományos irodalomban fellelhető adatokkal.

Az Azatioprin metabolitok vizsgálata fontos szereppel bír a terápiás gyógyszer szint beállításában, mely a kezelés hatékonysága szempontjából kiemelten fontos. Munkánk során kifejlesztettünk és az Európai Gyógyszerügynökség kritériumai szerint validáltunk egy UHPLC-MS módszert két Azatioprin metabolit, a 6-tioguanin és a 6-metilmerkaptopurin analizésére. A validált módszert azatioprin kezelés alatt álló autoimmun hepatitiszben szenvedő betegek vérmintáin teszteltük. A kifejlesztett módszer alkalmasnak bizonyult a két metabolit koncentrációjának meghatározására, emellett az általunk meghatározott koncentráció értékek összhangban voltak a gyógyszer dózisával is. Az eredmények alapján a kifejlesztett módszer alkalmas a vizsgált molekulák mennyiségi meghatározására klinikai mintákban, és segíthet a gyógyszer dózisának optimalizálásában a kezelés során.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kalló Gergőnek a folyamatos támogatásért, segítségéért, útmutatásért, melyek nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönetet mondok Dr. Csősz Éva professzor asszonynak, a szakmai iránymutatásért és hogy a munkámat a Proteomika Szolgáltató Laboratóriumban végezhettem.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tózsér József professzor úrnak a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet vezetőjének a lehetőségért, hogy a munkámat az intézet keretein belül végezhettem.

Köszönetet mondok Dr. Papp Mária professzor asszonynak és kutatócsoportjánk, különösen Dr. Kováts Patrícianak az azatioprin mérések során végzet munkájukért és azért, hogy a beteg mintákat rendelkezésünkre bocsátották. Külön köszönöm Dr. Mezei Zoltánnak a validációs mérésekkel kapcsolatos tanácsait.

Ezúton köszönöm meg a Proteomika Szolgáltató Laboratórium jelenlegi és korábbi munkatársának, PhD hallgatójának a segítségért, támogatásáért különösképpen, Kökényesiné Csáki Juliannának, Csatári-Kovács Renátának, Bertalan Pertra Magdolnának, Dr. Márkus Bernadettnek és Bába Orsolyának.

Végül, de nem utolsó sorban nagy hálával tartozom a családomnak, édesanyámnak és a fiamnak, hogy mindig számíthattam rájuk és segítettek a céljaim elérésében.

A kutatás az NKFIH FK 134605, GINOP-2.3.4-15-2016-00002 és TKP2021-EGA-20 (Biotechnológia) pályázatok által valósulhat meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/55/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Guba Andrea  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Guba, A.**, Kováts, P., Mezei, Z. A., Papp, M., Csósz, É., Kalló, G.: Analysis of Azathioprine Metabolites in Autoimmune Hepatitis Patient Blood-Method Development and Validation. *Int. J. Mol. Sci.* 25 (20), 1-12, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms252011233>  
IF: 4.9 (2023)
2. **Guba, A.**, Bába, O., Tőzsér, J., Csósz, É., Kalló, G.: Fast and Sensitive Quantification of AccQ-Tag Derivatized Amino Acids and Biogenic Amines by UHPLC-UV Analysis from Complex Biological Samples. *Metabolites.* 12 (3), 272, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo12030272>  
IF: 4.1

### További közlemények

3. Csengő, E., Lőrincz, H., Csósz, É., **Guba, A.**, Kárai, B., Tóth, J., Csiha, S., Paragh, G., Harangi, M., Nagy, G. G.: Newly Initiated Statin Treatment Is Associated with Decreased Plasma Coenzyme Q10 Level After Acute ST-Elevation Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* 26 (1), 1-18, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26010106>  
IF: 4.9 (2023)
4. Arianti, R., Vinnai, B. Á., Győry, F., **Guba, A.**, Csósz, É., Kristóf, E., Fésüs, L.: Availability of abundant thiamine determines efficiency of thermogenic activation in human neck area derived adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 119, 1-13, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109385>  
IF: 4.8





5. Nokhoijav, E., **Guba, A.**, Vadadokhau, U., Tözsér, J., Györi, Z., Kalló, G., Csósz, É.: Comparative Analysis of Amino Acid and Biogenic Amine Compositions of Fermented Grape Beverages. *Metabolites*. 13 (8), 1-13, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo13080892>  
IF: 3.4
6. Vámos, A., Arianti, R., Vinnai, B. Á., Alrifai, R., Shaw, A., Póliska, S., **Guba, A.**, Csósz, É., Csomós, I., Mocsár, G., Lányi, C., Balajthy, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: Human Abdominal Subcutaneous-Derived Active Beige Adipocytes Carrying FTO rs1421085 Obesity-Risk Alleles Exert Lower Thermogenic Capacity. *Front. Cell. Dev. Biol.* 11, 1-18, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2023.1155673>  
IF: 4.6
7. Nokhoijav, E., **Guba, A.**, Kumar, A., Kunkli, B., Kalló, G., Káplár, M., Somodi, S., Garai, I., Csutak, A., Tóth, N., Emri, M., Tözsér, J., Csósz, É.: Metabolomic Analysis of Serum and Tear Samples from Patients with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1-19, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23094534>  
IF: 5.6

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 32,3**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.14.

